مهندسی متالورژی و مواد

https://jmme.um.ac.ir/



داربست‌های کامپوزیتی ژلاتین-فسفات کلسیم: از فرایند ساخت تا بررسی رفتار مکانیکی و زیستی*

مقاله پژوهشی

فائزه درویشیان حقیقی[۱] سحر معاونی[۲] سحر ملازاده بیدختی[۳] سمانه صاحبیان سقی[٤] زهرا طیرانی نجاران[٥]

DOI: 10.22067/jmme.2022.71323.1019

چکیده *هدف پژوهش حاضر، ساخت داربست‌های کامپوزیتی از طریق فرایند انحلالی و خشکایش سرمایشی می‌باشد. اولین مرحله، فراوری ذرات کلسیم‌فسفات به روش سل‌ژل و سپس، عملیات حرارتی ذرات در دمای ۱۱۰۰°C است. طبق نتایج آنالیز تعیین اندازه ذرات و پیکنومتری، اندازه ذرات و دانسیته آنها به ترتیب برابر با ۳۷±۵ nm و ٤/۰٦ g/cm³ می‌باشد. همچنین طبق نتایج حاصل از آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD) و آنالیز حرارتی افتراقی (DTA-TG)، تبلور فاز فسفات کلسیم با عبور از دمای ۸۰۰ °C آغاز گردید. پیوندهای ایجادشده در ساختار نیز توسط طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) شناسایی شد. طبق تصویربرداری توسط میکروسکوپ AFM زبری سطح ذرات فراوری‌شده ۱۷/۳۲ nm است. به‌منظور درک رفتار مکانیکی و ریزساختاری داربست‌ها آزمون خمش سه‌نقطه و تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی (FESEM) انجام شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که استحکام خمشی نهایی داربست برابر با ۱۵±۱/۳MPa بوده و دارای ریزساختاری کاملاً متخلخل می‌باشد. مطالعه رفتار زیستی داربست توسط آنالیز Resazurin Red Assay نیز عدم سمیت، رشد و تکثیر مطلوب سلول‌های بنیادی مغز دندان عقل را در مجاورت با داربست اثبات کرد. همچنین قراردادن داربست‌ها در محلول شبیه‌سازی‌شده بدن با رهایش مطلوب یون‌های Ca^{2+}، Si^{4+} و PO_4^{3-} همراه بود. بنابراین، می‌توان ادعا کرد داربست‌های ژلاتین- فسفات‌کلسیم می‌توانند برای ترمیم بافت‌های آسیب‌دیده استخوانی مفید واقع شوند.*

واژه‌های کلیدی داربست کامپوزیتی، ژلاتین، کلسیم‌فسفات، کشت سلول‌های بنیادی، خواص مکانیکی و زیستی.

Gelatin-Calcium Phosphate Composite Scaffold: From Fabrication to Mechanical and Biological Properties Investigation

Faezeh Darvishian Haghighi Sahar Moaveni Sahar Mollazadeh Beidokhti Samaneh Sahebian Saghi Zahra Tayarani Najaran

Abstract *The fabrication of the most similar structure to the bone with appropriate mechanical, physical, and biological characteristics is challenging. The main aim of the present research is to design, fabricate, and characterize the gelatin-calcium phosphate composite scaffolds. First, calcium phosphate particles (SCP) were synthesized through the sol-gel process. Accordingly, the prepared particles were synthesized via the sol-gel route and heat-treated at 1100 ℃ Then, the gelatin-calcium phosphate composite scaffolds were fabricated through solvent casting and freeze-drying methods. According to the pycnometer and particle size (PSA) analyses, the density and the particle size of the SCP particles were 4.06 g/cm³ and 37±5 nm, respectively. Based on the XRD and DTA-TG results of the particles, crystallization of the calcium phosphate phases has been started at 800 ℃ The functional groups of the particles have been also studied through FTIR analysis. The roughness of the particles was 17.32nm based on the AFM microscopy results. According to the three-point flexural test, the final strength of the scaffolds was 15 MPa. Field emission scanning electron microscopy (FESEM) showed that the scaffolds have had completely porous structure with interconnected pores. Resazurin Red Assay confirmed the viability of 78% of stem cells on the scaffolds after 5 days of seeding. Immersion of the scaffolds in the simulated body fluid (SBF) caused the controlled release of the Ca^{2+}, Si^{4+}, and PO_4^{3-} ions. Altogether, the gelatin-calcium phosphate composite scaffolds have a promising role in tissue engineering applications.*

Key Words: Bone Scaffold, Gelatin, Calcium phosphate, Stem Cell Culture, Mechanical and Biological Properties.

* تاریخ دریافت مقاله ۱٤۰۰/٤/۱٥و تاریخ پذیرش آن ۱٤۰۱/۸/۱۰ می‌باشد.

(۱) دانشجوی دکتری مهندسی متالورژی و مواد دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.
(۲) دکترای حرفه‌ای داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران.
(۳) نویسندهٔ مسئول، استادیار گروه مهندسی متالورژی و مواد دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.
(٤) استادیار گروه مهندسی متالورژی و مواد، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران.
(٥) استاد گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ایران.

Email: mollazadeh.b@um.ac.ir

مقدمه

درعصر اخیر، نیاز به جایگزینی بافت استخوان به دلیل افزایش جمعیت سالخورده و مبتلا به سرطان استخوان، آسیب‌های ورزشی و تصادفات افزایش یافته‌است [1]. به منظور نیل به این هدف، تلاشهای بسیاری برای طراحی و آماده‌سازی مواد جدید در زمینه‌ی مهندسی بافت استخوان انجام شده‌است. استخوان نانوکامپوزیتی طبیعی شامل کلاژن و هیدروکسی‌آپاتیت است که درآن ذرات فسفات کلسیم و یا آپاتیت به عنوان فاز تقویت‌کننده و پلیمر کلاژن به عنوان فاز زمینه می‌باشد [2]. وجود ساختاری متخلخل با شبکه‌ای به‌هم‌پیوسته از حفرات در محدوده ابعادی ۲۰۰μm-۶۰۰ ساده‌ترین مشخصه بافت استخوان می‌باشد. همچنین استحکام خمشی و مدول فشاری استخوان اسفنجی انسان به‌ترتیب برابر با ۲۰MPa -۱۰ و GPa ۰/۶-۰/۰۵ می‌باشد [3,4]. شناخت کافی و تقلید از ساختار یادشده، در طراحی مواد کارامد، جهت ترمیم استخوان‌های شکسته مطلوب می‌باشد [5]. مطالعه تاریخچه مواد ترمیم‌کننده استخوان، استفاده از فلزّاتی چون فولاد زنگ‌نزن و آلیاژهای تیتانیوم را به عنوان اولین موادی که برای بازسازی ساختار آسیب‌دیده به‌کاررفته نشان می‌دهد. از جمله معایب فلزات یادشده، استحکام نهایی زیاد، عمرکاری محدود، نیاز به عمل جراحی مجدد به‌منظور خارج نمودن قطعات از بدن و عدم زیست‌فعّالی می‌باشد [6].

در سال‌های اخیر، به‌منظور غلبه بر محدودیت‌های یادشده، ایده ساخت و استفاده از داربست‌های کامپوزیتی پلیمر-سرامیک مطرح شده‌است. درواقع داربست ساختاری سه‌بعدی است که از تکثیر، رشد و پراکنده‌شدن سلول‌ها حمایت کرده و به گسترش و ترمیم بافت کمک می‌کند [7]. ساخت و به‌کارگیری ساختار یادشده در مهندسی بافت بسیارحائز اهمیت می‌باشد [8]. به‌منظور پرهیز از ایجاد تنش، خواص مکانیکی داربست‌ها نیز بایستی مشابه با محدوده بافت مجاور باشد [5]. امروزه، تنوعی در کامپوزیت‌های بایوپلیمر/بایوسرامیک مانند هیدروکسی‌آپاتیت-کلاژن، هیدروکسی‌آپاتیت-چیتوسان و هیدروکسی‌آپاتیت-ژلاتین/ اسیدپلی‌لاکتیک مشاهده می‌شود [9]. کامپوزیت‌های پایه ژلاتین نیز در شکل‌های متنوعی شامل داربست‌های متخلخل، نانوالیاف و هیدروژل، تولید و برای بازسازی استخوان قابل استفاده‌اند [2]. لیلا بختیاری و همکارانش داربست‌های سه‌بعدی ژلاتین- فسفات کلسیم را با حفراتی در محدوده اندازه ۲۰۰μm-۱۰۰ با استفاده از پودر نفتالن و نیز فریزدرای تولید کردند [10].

قابل ذکر است که استفاده از نفتالن به‌منظور تولید حفرات در ساختار، رفتار زیستی را با مشکل مواجه می‌کند و بنابراین توصیه نمی‌شود. مهدی کاظم‌زاده و همکارانش نیز داربست‌های ژلاتین-هیدروکسی‌آپاتیت را با استحکام فشاری نهایی ۳۲MPa به کمک استفاده از دستگاه فریزدرایر تولید کردند [11]. هانگلین لو و همکارانش داربست‌های نانوکامپوزیتی شیشه زیست‌سازگار-ژلاتین را ساختند. طبق نتایج، با اعمال پوشش ژلاتینی، استحکام فشاری داربست از ۴۵kPa به ۱۳۸kPa به بیشترین مقدار خود رسیده است [12]. قربانی و همکاران نیز بیشترین مقدار استحکام فشاری داربست‌های هیدروکسی‌آپاتیت-ژلاتین حاوی دگزامتازون را برابر با ۲/۴۵MPa گزارش کردند [13]. متعاله و همکارانش ابتدا با استفاده از شیشه‌های زیست‌سازگار 45S5، داربست‌هایی سه‌بعدی به کمک روش چاپ سه‌بعدی ساختند. سپس تأثیر نوع پوشش پلیمری را بر رفتار مکانیکی و زیستی داربست مطالعه کردند. بیشترین استحکام فشاری نهایی داربست-های پوشش داده‌شده با چیتوسان و ژلاتین به‌ترتیب ۱۴MPa و ۸MPa گزارش شده‌است [14].

همچنین اخیراً ساخت داربست‌های کامپوزیتی زیست سازگار با استفاده از روش‌های پیشرفته مانند استفاده از پرینترهای سه-بعدی توجه زیادی را به سمت خود جلب کرده‌است. اگرچه ساخت داربست‌های استخوانی به کمک پرینتر سه‌بعدی، ایجاد ساختاری یکنواخت با حفراتی در ابعاد مورد نظر را تأمین می‌کند، اما تجاری‌سازی محصول حاصل از آن، از لحاظ اقتصادی مقرون-به‌صرفه نیست. درحالی که در روش‌های سنتی مانند خشکایش سرمایشی و تصفیه ذرات نمک می‌توان به سهولت فراوری، نیاز به حداقل تجهیزات و هزینه بسیار اندک تولید اشاره کرد. بنابراین، بهینه‌سازی روش‌های قدیمی موجود توسط روش‌های مهندسی ساده- اصلاح و بهبود روش‌های سنتی- و نیز تلفیق علوم پزشکی و مهندسی می‌تواند بر ضعف‌های ناشی از آنها غلبه کند.

هدف از پژوهش حاضر، ساخت داربست‌های ژلاتین-فسفات کلسیم به کمک روش سنتی فرایند انحلالی و نیز استفاده از خشک‌کن سرمایشی می‌باشد. اصلاح و بهبود روش سنتی مذکور و نیز اعمال پوشش سیلیسی برروی داربست به‌منظور بهبود رفتار مکانیکی و زیستی از جمله نوآوری‌های پژوهش حاضر است. بدین‌منظور مشخصه‌یابی‌های مکانیکی، فیزیکی و زیستی کامل داربست‌های یادشده و نیز مشخصه‌یابی‌های حرارتی

و فیزیکی ذرات تقویت‌کننده کلسیم‌فسفات نیز گزارش شده‌است.

مواد و روش تحقیق

مواد اولیه

همه مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمایش، بدون نیاز به استفاده از فرایند تخلیص بودند. به منظور سنتز ذرات کلسیم-فسفات SCP در سیستم‌های سه‌تایی $64SiO_2$- $28CaO$- $8P_2O_5$ از پیش‌ماده‌هایی حاوی اکسیدهای سیلیسیم، کلسیم و فسفر استفاده-گردید. پس از آماده‌سازی نهایی ذرات، ساخت کامپوزیت‌های ژلاتین-کلسیم‌فسفات با استفاده از ژلاتین خوراکی انجام‌گرفت. مواد اولیه به‌کاررفته در فراوری ذرات بایوگلس در جدول (۱) آمده‌است.

جدول ۱ مواد اولیه مورد نیاز به‌منظور تهیه ذرات شیشه در سیستم سه‌تایی SiO_2- CaO- P_2O_5

نام ماده	فرمول شیمیایی	نام شرکت	علت استفاده
ترا اتیل اورتوسیلیکات	$C_8H_{20}O_4Si$	Merck	پیش‌ماده SiO_2
کلسیم‌نیترات چهارآبه	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	Merck	پیش‌ماده CaO
تری‌اتیل‌فسفات	$C_6H_{15}O_4P$	Merck	پیش‌ماده P_2O_5
اسیدنیتریک	HNO_3	Merck	کاهش pH
اتانول (۹۶٪)	C_2H_5OH	پارس‌الکل	حلال
آمونیاک	NH_4OH	اوربیتال	افزایش pH

فراوری ذرات فسفات کلسیم SCP

ابتدا ذرات کلسیم‌فسفات به‌روش سل‌ژل در سیستم سه‌تایی $64\%SiO_2$-$28\%CaO$-$8\%P_2O_5$ (درصد مولی) با استفاده از پیش‌ماده‌های یادشده فراوری شد [15]. سل‌های مورد نیاز از پیش‌ماده‌های مذکور، آماده و به‌منظور انجام واکنش هیدرولیز، سه روز در دمای محیط نگهداری شد. برای انجام واکنش هیدرولیز از اتانول، آب دیونیزه و نیز اسیدنیتریک به عنوان کاتالیزور باهدف سرعت بخشیدن به واکنش استفاده شد. پس از مخلوط سل‌های TEOS و TEP، منبع اکسیدکلسیم به سل‌های اولیه، اضافه شد. به‌منظور وقوع فرایند تراکم و ژل‌شدن سل، pH به ۱۱ رسانده شد. سپس ژل حاصل به مدت ۱۴ روز در دمای محیط نگهداری شد تا پیرسازی ساختار رخ‌داده و نیز حداکثر میزان واکنش‌های هیدرولیز و تراکم انجام‌شود. درمرحله بعد، ژل یادشده به مدت یک روز در خشک‌کن با دمای ۸۰°C خشک شد. پس از آن خردایش اوّلیه ذرات توسط هاون پرسلانی انجام و نمونه‌ها درون بوته سرامیکی ریخته‌شد. سپس بوته، درون کوره قرار گرفته و با سرعت ۱۱°C/min در دمای ۱۱۰۰°C عملیات حرارتی و سپس در کوره خاموش سرد گردید. در مرحله بعد، نمونه عملیات حرارتی‌شده با هاون پرسلانی خرد و با الک دارای مش‌بندی ۴۰۰، الک گردید. در نهایت نیز ذرات کلسیم‌فسفات به‌مدت ۱روز در بشر شیشه‌ای قرارگرفت تا نیروهای الکترواستاتیک موجود در آن حذف شوند و از توده‌ای شدن ذرّات در حین کامپوزیت‌سازی جلوگیری شود.

ساخت داربست‌های ژلاتین- کلسیم‌فسفات

داربست‌های ژلاتین-کلسیم‌فسفات حاوی ۶۰ درصد وزنی فاز تقویت‌کننده شیشه‌سرامیکی است. به منظور ساخت کامپوزیت‌ها از فرایند انحلالی استفاده شد. بدین‌ترتیب از ژلاتین خوراکی، آب دی‌یونیزه و ذرات کلسیم‌فسفاتی فراوری‌شده در مرحله قبل، استفاده گردید. ابتدا محلول ژلاتین ٪۷ وزنی به کمک روش اعمال حرارت غیر مستقیم – در محدوده ۴۰ تا ۵۰°C – تهیه گردید. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، محلول حاصل سه مرتبه باکمک آلتراسون پروبی با شرایط زمانی ۳۵۰ثانیه، تعداد سیکل ۱۰عدد و توان ۲۰ وات آلتراسون شد.

سپس با رعایت نسبت ۶۰ درصد وزنی، پودر شیشه-سرامیکSCP به محلول ژلاتین اضافه و در دمای محیط هم‌زده شد. مخلوط حاصل به قالب‌های پلی‌اتیلنی منتقل شده و بلافاصله درون یخچال قرارگرفت. پس از گذشت ۴۸ساعت، نمونه‌ها از درون قالب خارج و پوشش‌دهی بر روی آنها انجام شد. بدین-ترتیب که نسبت برابر تئوس و آب بایکدیگر مخلوط و به مدت حداقل نیم‌ساعت در دمای محیط هم‌زده‌شد. با افزودن آمونیاک، ژل‌شدن سل اتفاق افتاد. سپس نمونه‌های کامپوزیتی به کمک اسپاتول، درون سل حاصل، غوطه‌ور گردیده و پوشش‌دهی شد. درنهایت نمونه‌ها به یخچال منتقل شد. پس از گذشت حداقل ۳ ساعت، نمونه‌ها به فریزر با دمای ۱۸°C– منتقل و ۲۴ ساعت در آن نگهداری گردید. درنهایت تمامی نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در فریزدرایر مدلFD-10V در دمای ۵۰°C– قرار گرفت.

مشخصه‌یابی ذرات کلسیم‌فسفات (SCP)

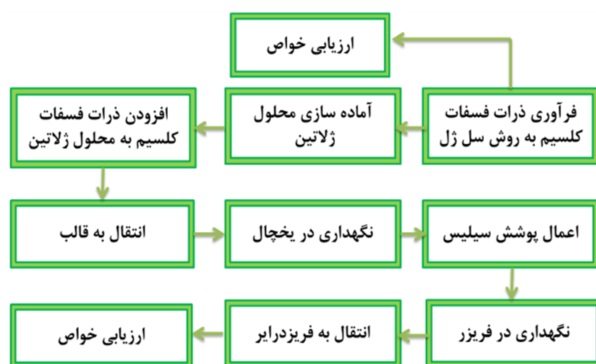
بررسی رفتار حرارتی ذرات فسفات کلسیم آنالیز حرارتی افتراقی DTA و نیز وزن‌سنجی حرارتی TG توسط دستگاه (TG/DTA)Thermogravimetric/Differential Thermal Analyzer مدل Pyris Diamon انجام‌شد. آنالیز مذکور برروی ذرات SCP فراوری‌شده با نرخ ۱۰°C/min و تا دمای ۱۱۰۰°C انجام گردید. به‌منظور تعیین گروه‌های ساختاری ذرات از آنالیز Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) توسط دستگاه Thermo Nicolet مدل AVATAR 370 FT-IR استفاده شد. بدین‌صورت که مقدار جزئی از نمونه پودری به همراه ماده مرجع برید پتاسیم قرصی ساخته شده و تحت تابش نور مادون قرمز قرار گرفت. آنالیز فازی پراش پرتو ایکس XRD (X-ray diffraction) نیز به منظور تعیین فازهای متبلورشده در ذرات SCP توسط دستگاه PHILIPS PW1730 با مشخّصات λ=1/540598° و □80-10 =2θ انجام‌شد. به منظور تعیین زبری سطح ذرات نیز از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) با دستگاه Atomic Force Microscope مدل Full plus استفاده شد. تعیین اندازه ذرات با آنالیز تعیین اندازه ذرّات (PSA) توسط دستگاه Particle Size Analyzer-CORDOUAN مدل Vasco3 انجام‌شد. برای این کار، مقدار جزیی از نمونه در ۱۰ml (۰,۰۱گرم در لیتر) آب دی‌یونیزه توسط آلتراسون پروبی توزیع و آنالیز انجام‌شد. همچنین دانسیته و پتانسیل زتای ذرات یادشده نیز به‌ترتیب توسط دستگاه پیکنومتر گازی و دستگاه تعیین پتاسیل زتا (ZP) بررسی گردید. به منظور تعیین دانسیته ذرات SCP، ابتدا ذرات داخل هاون پرسلانی خرد شدند. سپس به منظور تعیین حجم، ذرات در داخل محفظه پیکنومتر و در معرض گاز بی‌اثر هلیوم قرار داده‌شد. در مرحله نهایی، با استفاده از رابطه بین حجم و فشار، دانسیته ذرات اندازه‌گیری شد. از دستگاه پتانسیل زتا نیز به منظور اندازه‌گیری بار سطحی ذرات استفاده گردید. بدین‌منظور ذرات جامد درون آب توزیع شده و با اعمال ولتاژ توسط دستگاه، بار موجود برسطح ذرات SCP اندازه‌گیری گردید.

مشخصه‌یابی داربست‌های ژلاتین- کلسیم‌فسفات

آزمون استحکام خمشی سه‌نقطه توسط دستگاه SANTAM، فاصله دو تکیه‌گاه برابر با ۱۵ میلی‌متر و با سرعت ۰/۲mm/min برای داربست‌ها با ابعاد $۴×۴×۲۷mm^3$ با ۸ بارتکرار انجام‌شد.

بررسی‌های ریزساختاری میکروسکوپی از سطح شکست داربست‌های ژلاتین- فسفات کلسیم پس از آزمون خمش توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی LEO - Germany مدل VP 1450 نمونه‌ها انجام‌شد. همچنین به منظور بررسی رفتار زیستی داربست، از آنالیز Resazurin Red Assay و مجاورت داربست با سلول‌های بنیادی مغز دندان عقل استفاده‌شد. بدین‌صورت که ابتدا کشت و رشد کافی سلول‌های یادشده در محیط کشت DMEM در انکوباتور با دمای ۳۷°C و حاوی ٪۵ گاز CO_2 انجام و از سلول‌ها در پاساژ پنجم استفاده شد. سپس داربست‌ها به کمک اتانول ٪۷۰ و نیز محلول شست‌وشوی PBS استریل‌شدند. پس از آن داربست‌های استریل‌شده درون میکروتیوب‌های ۲ml گذاشته‌شد. سپس ۵۰۰μl سوسپانسیون سلولی با غلظت $۲×۱۰^۴$ سلول برروی داربست‌ها ریخته شد و به مدت ۵ ساعت درون انکوباتور نگهداری گردید. پس از آن، محتویات داخل هر میکروتیوب به یک خانه از ظروف ۲۴خانه منتقل و داربست‌ها به مدت زمان ۵ روز درون انکوباتور نگهداری شدند. در مرحله نهایی با هدف تعیین درصد سلول‌های زنده برروی داربست‌ها از آنالیز Resazurin Red Assay استفاده شد. بدین منظور پس از گذشت مدت زمان معین از ریختن رنگ آلاماربلو برروی داربست‌ها، از دستگاه Microplate – Reader برای خوانش عدد جذب استفاده شد. پس از کشت سلول نیز مجدداً ریزساختار داربست توسط میکروسکوپ FESEM مورد بررسی قرارگرفت. همچنین به منظور بررسی رفتار زیست‌سازگاری داربست‌ها از مجاورت آنها با محلول شبیه‌سازی‌شده بدن (SBF) در مدت زمان‌های ۳ ساعت، ۱، ۳، ۷ و ۲۱ روز استفاده شد. محلول استاندارد یادشده از انحلال پیش‌ماده‌های NaCl، $NaHCO_3$، KCl، K_2HPO_4، $MgCl_2.6H_2O$، $CaCl_2$ و Na_2SO_4 در آب دیونیزه آماده شد. غلظت‌های یونی محلول SBF مشابه با پلاسمای خون انسان است. پس از آماده‌سازی محلول، نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت، ۱، ۳، ۷ و ۲۱ روز درون محلول یادشده و داخل انکوباتور چرخشی با دمای ۳۷°C قرار گرفتند. پس از گذشت زمان‌های مذکور، آنالیز پلاسمای جفت‌شده القایی (ICP) و نیز آنالیز XRD به‌ترتیب برروی محلول SBF مجاورشده با داربست و نیز داربست انجام شد. بررسی میزان رهایش یون‌های سیلیسیم، کلسیم و فسفر درون محلول و نیز میزان تبلور فازی برروی داربست، اهداف اصلی انجام دو آنالیز یادشده است.

نمودار شماتیک مراحل ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌های مذکور در شکل (۱) آمده است.



شکل ۱ نمایش مراحل ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌های ژلاتین-کلسیم‌فسفات

نتایج و بحث

مشخصه‌یابی ذرات کلسیم‌فسفات SCP

آنالیز حرارتی DTA-TG بر روی ذرات SCP انجام شده و نتایج آنالیز مذکور بر روی ذرات SCP در شکل (۲) آمده‌است. طبق نتایج، در ابتدا وقوع یک پدیده گرماگیر قابل مشاهده است. این مرحله که با کاهش جرمی در محدوده ۵۰ تا ۲۰۰°C همراه است، مربوط به خروج آب جذب‌شده به صورت فیزیکی و نیز خروج آب و الکلی است که طی مراحل خشک نمودن، قادر به خروج نبوده و در ساختار باقی مانده‌اند. جدایش مولکول‌های آب یادشده در دمای کم‌تر از ۱۰۰°C به‌وقوع می‌پیوندد. آب تبلوریافته موجود در ساختار نیز که به طور شیمیایی با پل‌های Si—O—Si دارای پیوند است، در دماهای بالاتری از ساختار حذف می‌گردد. این رخداد با حدود ۵/۲۵mg کاهش جرم در نمونه همراه است [15].

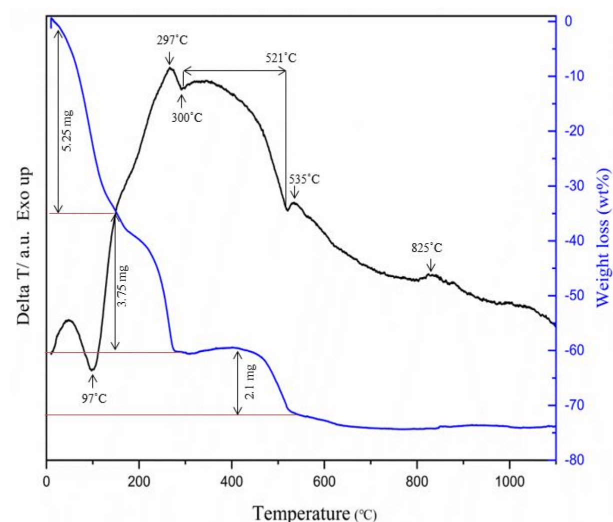
در مرحله هیدرولیز طبق واکنش (۱)، سیلانول‌ها (گروه‌های SiOH) تشکیل می‌شوند.



$$Si(OC_2H_5)_4 + 4H_2O \longrightarrow Si(OH)_4 + 4C_2H_5OH \qquad (۱)$$

پس از هیدرولیز با افزایش pH و نیز طی یک پدیده گرمازا، متراکم شدن ساختار رخ می‌دهد. بدین صورت که سیلانول‌های تشکیل شده در مرحله قبل، به سیلیس و آب تجزیه می شوند. کاهش وزن موجود در این مرحله می‌تواند به دلیل رهایش ناشی از وقوع تراکم گروه‌های سیلانول و نیز گروه‌های P-OH باشد [16].

همچنین واضح است که در اثر استفاده از کلسیم‌نیترات چهارآبه به عنوان پیش‌ماده اکسید کلسیم، مقدار قابل توجهی نیترات نیز به ساختار وارد شده است. همان‌گونه که پیشتر ذکرشد، خروج نیترات‌ها و نیز سایر مواد باقیمانده اضافی در ساختار پیش‌ماده اکسید فسفر (تری‌اتیل‌فسفات) پس از وقوع تراکم و طی یک واکنش گرمازای قوی تا قبل از رسیدن به دمای ۵۵۰°C بوده است. زیرا با رسیدن به دمای مذکور، طبق نمودار TG کاهش جرم در ساختار متوقف شده و پایداری قابل توجهی در نمودار نمونه قابل مشاهده است. طبق گزارش تمام مراجع مطالعه‌شده، پس از وقوع پدیده‌ها و واکنش‌های مذکور، اصلی‌ترین اتفاق‌هایی که در ساختار می‌افتد، شیشه‌ای‌شدن و نیز شروع تبلور است. در بالاتر از دمای ۸۰۰°C، طی پدیده‌ای گرمازا برای هر دو نمونه بلورینگی آغاز شده‌است.

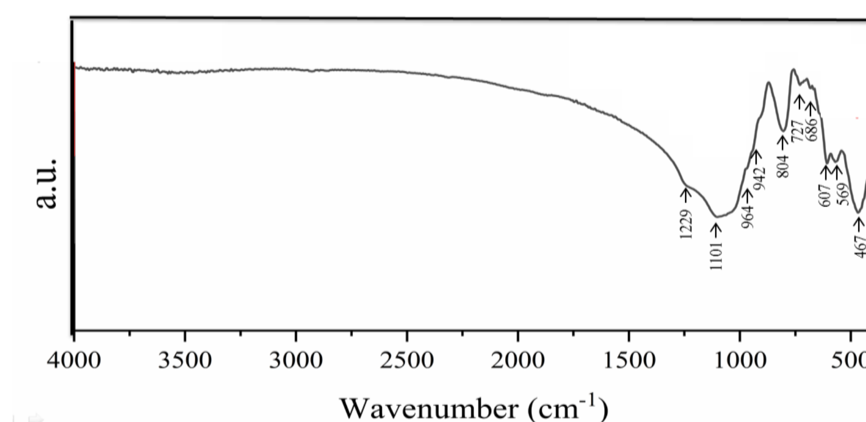


شکل ۲ نمودار آنالیز حرارتی DTA-TG ذرات SCP

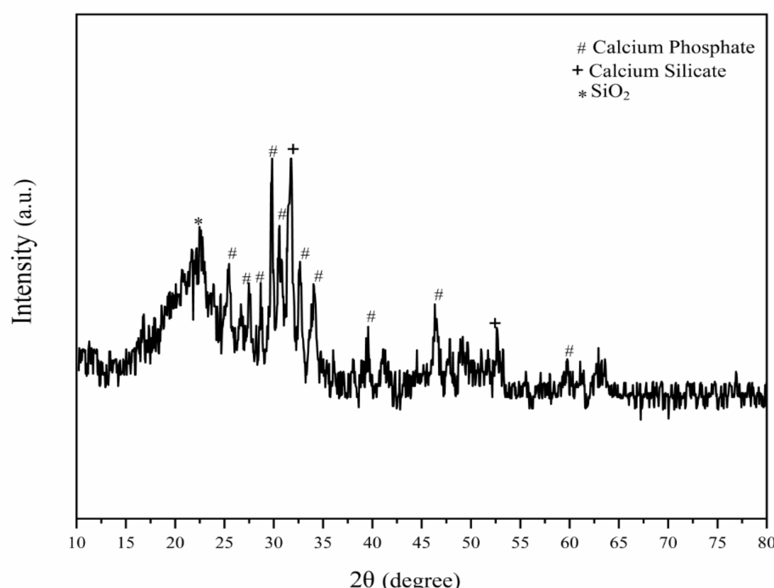
نتایج آنالیز FTIR ذرات SCP در شکل (۳) آمده است. برای یک شیشه زیستی 45S5، قله‌های جذب در cm^{-1} ۵۲۰–۴۵۰ متناظر با حالت‌های خمشی Si-O-Si و O-Si-O و به اشتراک‌گذاری ممکن گروه‌های O-P-O می‌باشد. قله‌های مشاهده‌شده در cm^{-1} ۸۲۰–۷۲۰ می‌تواند متناظر با کشش متقارن Si-O-Si در اکسیژنهای پل‌زن (BO) باشد. همچنین قله‌های موجود در محدوده cm^{-1} ۹۸۰–۹۲۰ متناظر با کشش Si-O با

اکسیژن‌های غیرپل‌زن (NBO) و به اشتراک‌گذاری ممکن ارتعاش‌های P-O-P می‌باشد. قله‌های مشاهده‌شده در ۱۱۲۰–۱۰۶۰ cm^{-1} نیز متناظر با کشش نامتقارن اکسیژن‌های پل‌زن (BO) در داخل فضای تتراهدرال و نیز به اشتراک‌گذاری ممکن گروه‌های یونی $P\text{-}O^{-}$ است. قله موجود در ۱۴۶۰ cm^{-1} متناظر با ارتعاش‌های گروه‌های کربناتی است و قله ۱۶۴۰cm^{-1} مربوط به ارتعاشات مولکولی OH در آب است. باندهای پهن در محدوده عدد موج ۳۴۵۰–۲۸۴۰cm^{-1} می‌تواند متناظر با گروه‌های هیدروکسیل یا آب و یا ارتعاشات SiOH و POH باشد. همچنین فرض می‌شود که باندهای گروه‌های فسفات که مقدارشان نیز محدود است، با باندهای ارتعاشی در محدوده عدد موج ۱۲۰۰–۴۵۰ cm^{-1} متناظر باشند [17]. نمودار FTIR ذرات SCP فراوری‌شده در شکل (۳) نیز نشان می‌دهد که در عدد موج ۴۶۷ cm^{-1} ارتعاش خمشی در پیوند Si–O رخ می‌دهد [18]. کشش متقارن P-O نیز در عدد موج ۵۶۹ cm^{-1} اتفاق می‌افتد. همچنین وقوع خمش P-O در گروه‌های PO_4^{3-} مربوط به عدد موج ۶۰۶ cm^{-1} می‌باشد [19]. در اعداد موج ۷۲۶cm^{-1} و ۸۰۴cm^{-1} کشش متقارن پیوند Si-O-Si در اکسیژن‌های پل‌زن (BO) دیده می‌شود [17]. کشش Si-O با اکسیژن‌های غیرپل‌زن (NBO) و به اشتراک‌گذاری ممکن ارتعاش‌های P-O-P نیز مربوط به عدد موج ۹۴۱ cm^{-1} می‌باشد. در عدد موج ۹۶۳cm^{-1} نیز ارتعاش کششی P-O رخ می‌دهد [17]. عدد موج ۱۱۰۱cm^{-1} مربوط به کشش Si-O-Si در ساختارهای خطی است [20].

همچنین آنالیز فازی XRD برروی ذرات SCP، به‌منظور تعیین فازهای ایجادشده در ساختار پس از عملیات حرارتی در دمای ۱۱۰۰ °C انجام شده‌است. نمودار آنالیز XRD ذرات کلسیم‌فسفات در شکل (۴) آمده است. نتایج نشان می‌دهد که تبلور فازهای کلسیم‌فسفات و کلسیم‌سیلیکات در نمونه آغاز شده‌است. در 2θ=۳۰° فازهای کلسیم‌سیلیکات با فرمول شیمیایی Ca_3SiO_5 و کلسیم‌فسفات با فرمول $Ca_3(PO_4)_2$، به ترتیب به استناد کارت‌های ICSD 00-016-0406 و ICSD 00-009-0348 تبلور یافته‌اند. فاز کلسیم‌فسفات متبلورشده در 2θ=۳۱° به کمک شناسایی با کارت‌های ICSD 01-086-1585 و ICSD 00-009-0348 به ترتیب می‌تواند کلسیم‌فسفات‌هایی از خانواده $Ca_3(PO_4)_2$ و $Ca(PO_3)_2$ باشد. در 2θ=۳۲° فاز کلسیم‌سیلیکات Ca_2SiO_4، توسط کارت ICSD 01-077-0420 تبلور یافته‌است. فازهای کلسیم‌فسفاتی مطابق با شماره کارت‌های ذکرشده قبلی، در 2θ=۳۴° و 2θ=۳۵° نیز متبلور شده‌است. همچنین قله‌های ضعیفی که نشان‌دهنده تبلور فازهای مشابه می‌باشد، در زوایای 2θ =۲۵°، 2θ=۲۷° و 2θ=۴۶° قابل مشاهده است. تطابق زاویه قله‌های ضعیف یادشده با کارت‌های ICSD 00-009-0348 و ICSD 01-086-1585 نشانی بر این مدعاست.

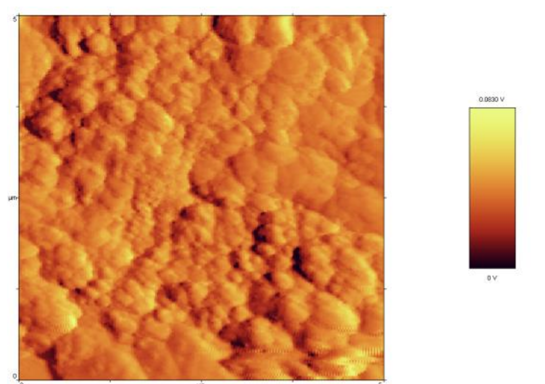


شکل ۳ نمودار آنالیز FTIR ذرات کلسیم‌فسفات SCP

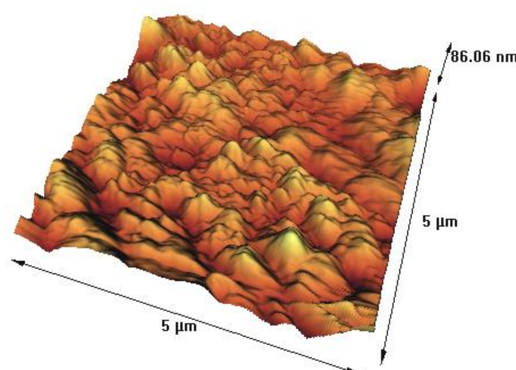


شکل ٤ آنالیز فازی ذرات کلسیم‌فسفات SCP

نتایج بررسی زبری سطحی ذرات کلسیم‌فسفات SCP که توسط میکروسکوپ نیروی اتمی AFM تهیه شده، در شکل (٥) آمده است. طبق بررسی‌ها، زبری سطح ذرات یادشده برابر با nm ١٧/٣٢ است. در واقع هر چه سطح زبرتر باشد، شرایط بهتری برای برقراری قفل‌های مکانیکی با زمینه پلیمری ژلاتین فراهم می‌شود. طبق بررسی‌های میکروسکوپی توسط میکروسکوپ AFM، سطح ذرات SCP از زبری مناسبی برخوردار می‌باشد. بنابراین انتظار می‌رود که استحکام نهایی داربست حاوی ذرات SCP مطلوب باشد. طبق مطالعات، ساختار کامپوزیتی ساختاری است که دو یا چند فاز کاملاً نامتجانس کنار هم قرار می‌گیرند. حضور دو فاز نامتجانس و کاملاً متفاوت در کنار هم نیاز به یک اتصال قوی در فصل مشترک دارد. راه‌های بسیاری برای افزایش ارتباط میان فاز زمینه و تقویت‌کننده وجود دارد. یکی از آنها وجود سطحی زبر در فاز تقویت‌کننده است. حضور پستی‌ها و بلندی‌های سطحی سبب فراهم‌نمودن شرایطی در افزایش قفل‌های مکانیکی بین فازهای زمینه و تقویت‌کننده است. زبری سطح ذرات SCP که توسط میکروسکوپ AFM شناسایی و اندازه‌گیری شده می‌تواند عاملی مؤثر در اتصال ذرات به فاز زمینه ژلاتینی، بهبود استحکام فصل مشترک و افزایش استحکام نهایی داربست کامپوزیتی باشد [21].



(الف)



(ب)

شکل تصاویر تهیه شده توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): (الف) سطح ذرات و (ب) توپوگرافی سطحی ذرات SCP

هدف از تعیین دانسیته، اندازه ذرات و پتانسیل زتای ذرات فسفات کلسیم، شناخت خواص فیزیکی ذرات SCP و نیز تأثیر آن بر خواص نهایی داربست‌های تقویت‌شده توسط آنها می‌باشد. همچنین علت تعیین پتانسیل زتای ذرات، تعیین میزان تمایل ذرات به توده‌ای شدن می‌باشد. هرچه پتانسیل زتای ذرات منفی‌تر باشد، تمایل ذرات به توده‌ای‌شدن و تجمع آنها کمتر خواهد بود. از طرفی با کاهش ابعاد ذرات، به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم، چسبندگی سلولی نیز افزایش خواهد یافت. نتایج دانسیته، اندازه و پتانسیل زتای ذرات در جدول (۲) آمده‌است. همچنین انجام عملیات حرارتی در دمای ۱۱۰۰°C سبب وقوع بلورینگی و افزایش میزان نظم‌های بلندبرد در پیوندهای ایجادشده در ساختار ذرات نسبت به حالت آمورف می‌شود. کاهش تعداد پیوندهای شکسته و ناکامل و افزایش پیوندهای Si-O-Si سبب کاهش فاصله بین اتمی و افزایش نظم و تراکم اتمی می‌گردد. به عبارت دیگر، افزایش تراکم ساختار سبب افزایش دانسیته ذرات می‌شود [21].

جدول ۲ دانسیته، اندازه و پتانسیل زتای ذرات فسفات کلسیم SCP

دانسیته (g/cm^3)	اندازه ذرات (nm)	پتانسیل زتا (mv)
٤/٠٦	۳۷±۵	-٦/٧

مشخصه‌یابی داربست‌های ژلاتین- کلسیم‌فسفات

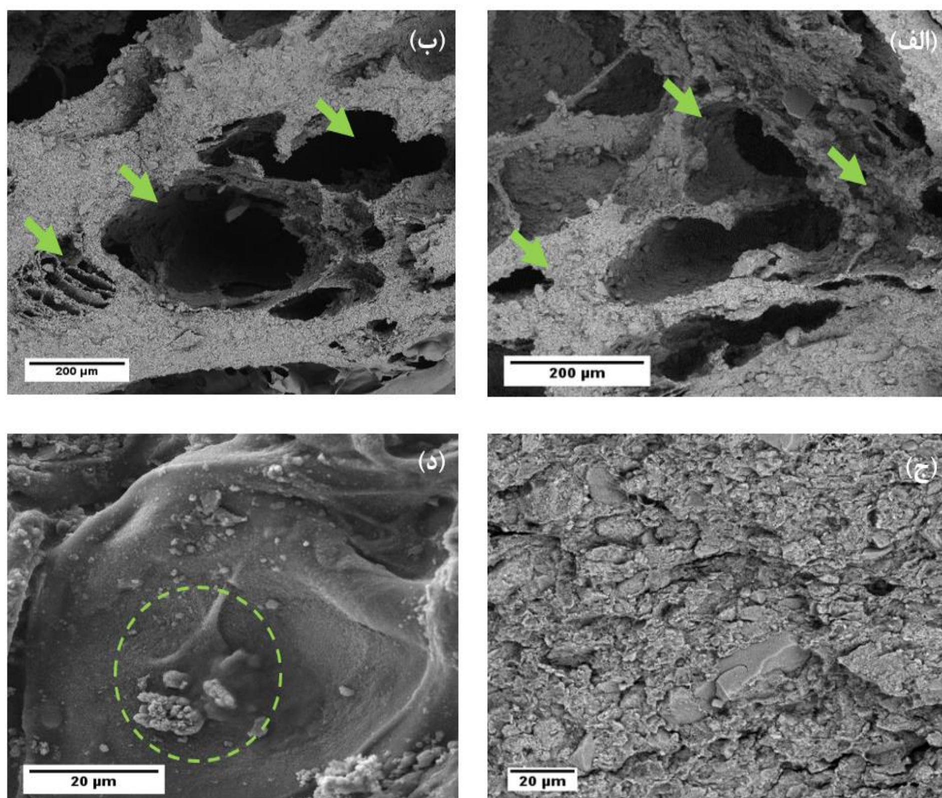
نتایج بررسی رفتار مکانیکی داربست در جدول (۳) آمده است. بررسی رفتار مکانیکی داربست یادشده طی آزمون خمش سه‌نقطه نشان داد اعمال پوشش سیلیسی سبب افزایش قابل توجه استحکام مکانیکی و مدول خمشی داربست در مقایسه با پژوهش قبل شده است. همچنین استحکام خمشی استخوان طبیعی در محدوده ۲۰MPa-۱۰ گزارش شده است و استحکام نهایی داربست‌های ساخته‌شده در پژوهش حاضر در این محدوده قرار می‌گیرد که یکی از دستاوردهای مهم پژوهش حاضر محسوب می‌شود [22]. همچنین همان‌گونه که بررسی زبری سطحی توسط میکروسکوپ AFM نشان داد، زبری سطح ذرات SCP سبب افزایش سطح ارتباط با ژلاتین، افزایش قفل‌های مکانیکی و درنتیجه بهبود استحکام نهایی داربست می‌شود.

نتایج تصویربرداری توسط میکروسکوپ FESEM از سطح شکست داربست پس از آزمون خمش سه‌نقطه نشان می‌دهد ساختاری کاملاً متخلخل در داربست ژلاتین-کلسیم‌فسفات ایجاد شده است. حضور حفرات به‌هم‌پیوسته در این ساختار می‌تواند مکان‌های مناسبی برای فعالیت‌های سلولی از جمله چسبندگی، تکثیر و پراکندگی سلولی فراهم‌کند. شکل (٦- الف- ج) تصویر ساختار متخلخل داربست را قبل از بررسی رفتار زیستی نشان می‌دهد. حضور حفرات به‌هم‌پیوسته در ابعاد گوناگون با علامت پیکان در شکل مشخص شده است. همچنین پس از ۵ روز کشت سلول‌های بنیادی بر روی داربست نیز حضور سلول‌های یادشده برروی دیواره‌های داربست قابل مشاهده است. شکل (٦-د) تصویر داربست یادشده را پس از کشت سلول نشان می‌دهد که حضور سلول بنیادی بر دیواره داربست در شکل مشخص گردیده است. همچنین نتایج آنالیز Resazurin Red Assay حضور ٪۷۸ سلول زنده را برروی داربست و نیز داخل حفرات موجود در آن تأیید کرد.

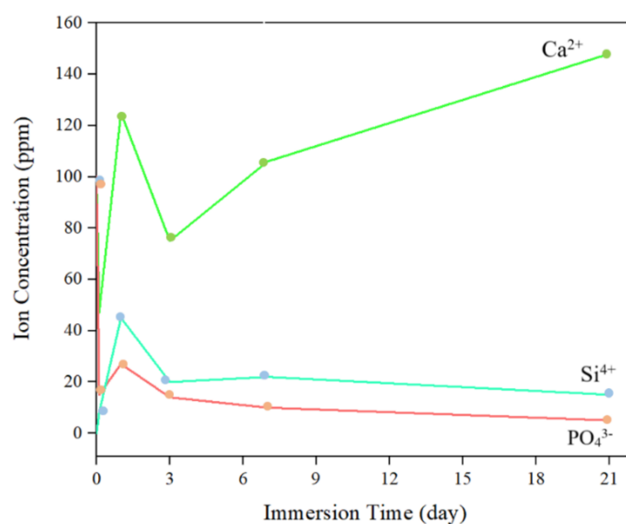
همان‌گونه که در بخش مشخصه‌یابی زیستی ذرات نیز ذکر شد، داربست‌های ژلاتین-فسفات‌کلسیم در محلول شبیه‌سازی شده بدن (SBF) قرارداده شدند تا رهایش یونی مورد بررسی قرار بگیرد. شکل (۷) نمودار رهایش یون‌های Ca^{2+}، Si^{4+}وPO_4^{3-} را در زمان‌های مختلف نشان می‌دهد. مقایسه کلی نمودار نشان می‌دهد که افزایش زمان ماندگاری داربست تا ۲۱ روز سبب افزایش غلظت یون کلسیم و کاهش غلظت یون‌های سیلیسیم و فسفر شده است. همان‌گونه که واضح است، مقدار ۱۰۰ppm از یون‌های Ca^{2+} وPO_4^{3-} در ابتدا در محلول SBF وجود دارد. به دلیل تشکیل فازهای فسفاتی طی قرارگیری داربست‌های یادشده در محلول SBF، یون PO_4^{3-} مصرف شده و مقدار آن با گذشت زمان کاهش یافته است. یون‌های Si^{4+} نیز رفتاری مشابه با گروه فسفاتی از خود نشان می‌دهند. بنابراین تشکیل فازهای حاوی سیلیکات نیز بعد از گذشت ۲۱ روز محتمل می‌باشد. رهایش یون‌های مذکور، اثباتی بر وجود ویژگی زیست‌فعالی و کمک به بازسازی بافت آسیب‌دیده استخوانی توسط داربست‌های ژلاتین-فسفات‌کلسیم پژوهش حاضر است [21].

جدول۳ نتایج آزمون خمش سه‌نقطه برروی داربست‌های ژلاتین-کلسیم‌فسفات

	استحکام خمشی نهایی (MPa)	مدول خمشی (MPa)	کرنش بیشینه
داربست ژلاتین- کلسیم‌فسفات	۱۵	۲۳۲±۷	۰/۰۵
استخوان طبیعی	۲۰-۱۰	-	-



شکل٦ تصاویر میکروسکوب FESEM مربوط به داربست ژلاتین-فسفات کلسیم: (الف-ج) قبل از کشت سلول و د) بعد از کشت سلول



شکل ۷ تغییرات غلظت یون‌های Ca^{2+}، Si^{4+} و PO_4^{3} با زمان

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، ساخت و مشخصه‌یابی داربست‌های ژلاتین–کلسیم‌فسفات به کمک فرایند انحلالی و فریزدرای انجام شده-است. بدین منظور ابتدا ذرات کلسیم‌فسفات در سیستم سه‌تایی $64SiO_2$- 28CaO- $8P_2O_5$ به روش سل‌ژل فراوری شده و مورد ارزیابی‌های متنوعی قرارگرفتند. تبلور فازهای فسفات کلسیم و سیلیسیم در ساختار ذرات توسط آنالیزهای XRD و DTA-TGA مشاهده شد. همچنین زبری سطح ذرات توسط میکروسکوپ AFM برابر با ۱۷/۳۲ nm گزارش شد که سبب افزایش قفل‌های مکانیکی با فاز زمینه پلیمری و در نتیجه بهبود استحکام نهایی داربست طی آزمون خمش سه‌نقطه شده‌است. بیشترین تنشی که داربست طی آزمون مکانیکی تحمل کرد ۱۵MPa است که مشابه با استحکام خمشی استخوان طبیعی می‌باشد. اندازه نانومتری ذرات تقویت‌کننده کلسیم‌فسفات سبب افزایش سطح ویژه و در نتیجه رفتار زیستی مطلوب‌تر داربست می‌شود. همچنین نتایج بررسی رفتار سلول‌های بنیادی برروی داربست‌ها نشان داد که امکان فعالیت‌های سلولی از جمله رشد، چسبندگی و تکثیر سلولی بر روی دیواره و نیز داخل حفرات داربست‌های ژلاتین–کلسیم فسفات وجود دارد. قراردادن داربست در محلول شبیه-سازی بدن (SBF) نیز با رهایش مطلوب یون‌های Ca^{2+}، Si^{4+} و PO_4^{3-} از داربست همراه بود که نشان‌دهنده زیست‌فعالی داربست می‌باشد.

مراجع

1. Kanhed, S., Awasthi, S., Goel, S., Pandey, A., Sharma, R., Upadhyaya, R., Balani, K., "Porosity distribution affecting mechanical and biological behaviour of hydroxyapatite bioceramic composites", *Ceraimcs International*. Vol. 43, pp. 10442–10449, (2017).
2. Kuttappan, S., Mathew, D., Nair, M. B., "Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering - A mini review", *International Journal of Biological Macromole.* Vol. 93, pp. 1390–1401, (2016).
3. M. Rizwan, M. Hamdi, W.J. Basirun, K. Kondoh, J. Umeda, Low pressure spark plasma sintered hydroxyapatite and Bioglass® composite scaffolds for bone tissue repair, *Ceramics International*, Vol. 44, pp. 23052–23062, (2018).
4. Kaur, G., Kumar, V., Baino, F., Mauro, J. C., Pickrell, G., Evans, I., Bretcanu, O., "(Mechanical properties of bioactive glasses, ceramics, glass-ceramics and composites: State-of-the-art review and future challenges", *Material Science and engineering C*, pp. 109895, (2019).
5. Fayyazbakhsh, F., Solati-Hashjin, M., Keshtkar, A., Shokrgozar, M. A., Dehghan, M. M., Larijani, B., "Novel layered double hydroxides-hydroxyapatite/gelatin bone tissue engineering scaffolds: Fabrication, characterization, and in vivo study", *Material Science and engineering C*. Vol. 76, pp. 701–714, (2017).
6. Palmero, P., "Ceramic-Polymer Nanocomposites for Bone-Tissue Regeneration", *Journal of Nanocomposites for Musculoskeletal Tissue Regeneration*, Elsevier Ltd, pp. 331-367 (2016).
7. Fayyazbakhsh, F., Solati-Hashjin, M., Shokrgozar, M. A., Bonakdar, S., Ganji, Y., Mirjordavi, N., Ghavimi, S. A., Khashayar, P., "Biological Evaluation of a Novel Tissue Engineering Scaffold of Layered Double Hydroxides (LDHs)", *Key Engineering Materials*, pp. 493–494, 902, (2011).
8. Huh, J. T., Lee, J. U., Kim, W. J., Yeo, M., Kim, G. H., "Preparation and characterization of gelatin/α-TCP/SF biocomposite scaffold for bone tissue regeneration", *International Journal of Biological Macromolcules*. Vol. 110, pp. 488–496, (2018).

9. Feng, S., He, F., Ye, J., "Hierarchically porous structure, mechanical strength and cell biological behaviors of calcium phosphate composite scaffolds prepared by combination of extrusion and porogen burnout technique and enhanced by gelatin", *Material Science and Engineering C,*. Vol. 82, pp. 217–224, (2018).
10. Bakhtiari, L., Reza, H., Mohamad, S., Ali, M., "Investigation of biphasic calcium phosphate / gelatin nanocomposite scaffolds as a bone tissue engineering", *Ceramics International,* Vol. 36, pp. 2421–2426, (2010).
11. Narbat, M. K., Orang, F., Hashtjin, M. S., Goudarzi, A., "Fabrication of Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *Iranian Biomedical Journal*, Vol. 10, No.4, Pp. 215–223, (2006).
12. Luo, Yi and Wang, Zhendong and Jin, Shaoqing and Zhang, Bin and Sun, Hongmin and Yuan, Xiaohong and Yang, Weimin, "Synthesis and crystal growth mechanism of ZSM-22 zeolite nanosheets", *Journal of CrystEngComm,* Vol. 18, Issue. 30, pp. 5611-5615 (2016).
13. Ghorbani, F., Nojehdehian, H., Zamanian, A., "Physicochemical and mechanical properties of freeze cast hydroxyapatite-gelatin scaffolds with dexamethasone loaded PLGA microspheres for hard tissue engineering applications", *Material Science and Engineering C.* Vol. 69, pp. 208–220, (2016).
14. Azadeh Motealleh, Siamak Eqtesadi, Fidel Hugo Perera, Antonia Pajares, Fernando Guiberteau, Pedro Miranda, Understanding the role of dip-coating process parameters in the mechanical performance of polymer-coated bioglass robocast scaffolds, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials,* Vol. 64, pp. 253-261, (2016).
15. M., Catauro, A. Dell'Era, S., Vecchio Ciprioti, "Synthesis, structural, spectroscopic and thermoanalytical study of sol-gel derived SiO_2-CaO-P_2O_5 gel and ceramic materials", *Thermochimica Acta.* Vol. 625, Pp. 20–27, (2016).
16. Taherkhani, S., Moztarzadeh, F., Mozafari, M., Lot, N., "Sol – gel synthesis and characterization of unexpected rod-like crystal fi bers based on", Vol. 358, pp. 342–348, (2012).
17. Abdelghany, A.M., ElBatal, H.A., Okasha, A. et al. Compatibility and Bone Bonding Efficiency of Gamma Irradiated Hench's Bioglass. *Journal of Silicon,* Vol. 10, pp. 1533–1541, (2018).
18. Nabian, N., Jahanshahi, M., Mahmood, S., "Synthesis of nano-bioactive glass – ceramic powders and its in vitro bioactivity study in bovine serum albumin protein", *Journal of Molecular Structure,* Vol. 998, pp. 37–41, (2011).
19. Faure, J., Drevet, R., Lemelle, A., Ben Jaber, N., Tara, A., El Btaouri, H., Benhayoune, H., "A new sol – gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst Preparation of Powder Gel", *Material science and engineering C,* Vol. 47, pp. 407–412, (2015).
20. Rubio, F., Rubio, J., Oteo, J. L., A FT-IR Study of the Hydrolysis of Tetraethylorthosilicate (TEOS), *Journal of Spectroscopy Letters, Vol. 31*, pp. 199-219, (1998).
21. Darvishian Haghighi, F., Mollazadeh Beidokhti, S., Tayarani Najaran, Z., Sahebian Saghi, S., "Highly improved biological and mechanical features of bioglass-ceramic/ gelatin composite scaffolds using a novel silica coverage", *Ceramics International,* Vol. 47, Issue 10, Part A, pp.14048-14061, (2021).
22. Darvishian Haghighi, F., Mollazadeh Beidokhti, S., Sahebian Saghi, S., Tayarani Najaran, Z., "Effect of manufacturing route on microstructure and mechanical properties of calcium phosphate/gelatin-starch composite scaffold", *Journal of Metallurgical engineering*, Vol. 22, Issue. 2, pp. 84-95, (2019), (In Persion).